

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020020057472 A
(43)Date of publication of application: 11.07.2002

(21)Application number: 1020010000515
(22)Date of filing: 05.01.2001

(71)Applicant: CJ CORP.
(72)Inventor: HAN, JONG GWON
JANG, JAE YEONG
KIM, JEONG HWAN
KWAK, YEONG HYEON
LEE, GWANG HO
LEE, JAE HEUNG
LEE, JIN HO
OH, YUN SEOK
PARK, JANG HUI
SIM, JAE IK

(51)Int. Cl. C12N 1/20

(54) CORYNEBACTERIUM AMMONIAGENES CJXP002 BEING CAPABLE OF PRODUCING 5'-XANTHYLIC ACID IN HIGHER YIELD AND PRODUCTION METHOD OF 5'-XANTHYLIC ACID BY USING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided are a microorganism, *Corynebacterium ammoniagenes* CJXP002, producing 5'-xanthylic acid in higher yield and having L-azetidine-2-carboxylic acid resistance, and a production method of 5'-xanthylic acid by using the same.

CONSTITUTION: *Corynebacterium ammoniagenes* CJXP002 (KFCC-11250) producing 5'-xanthylic acid(XMP) and showing L-azetidine-2-carboxylic acid resistance is obtained by treating *Corynebacterium ammoniagenes*(KFCC-10743) with NTG. Particularly, it is characterized by growing in the presence of an infinitesimal quantity of or 30g/l of L-azetidine-2-carboxylic acid. 5'-xanthylic acid is produced by the steps of: firstly shacking cultivation of *Corynebacterium ammoniagenes* CJXP002 (KFCC-11250) in a seed culture medium at 30 deg.C, pH 7.3 with 180 rpm for 24 hours; secondary shacking cultivation of the firstly cultured *Corynebacterium ammoniagenes* CJXP002 (KFCC-11250) in a seed culture medium at 31 deg.C, pH 7.3 with 900 rpm for 24 hours to activate it; and shacking cultivation of the secondary cultured *Corynebacterium ammoniagenes* CJXP002 (KFCC-11250) at 33 deg.C with 400 rpm for 90 hours in a fermentation medium, wherein if the content of sugar remaining in the culture solution is 1% or less, glucose can be added in the amount to reach total sugar content of 30%.

COPYRIGHT KIPO 2003

Legal Status

Date of final disposal of an application (20030731)

Patent registration number (1004023220000)

Date of registration (20031007)

(51) 。 Int. Cl. 7
C12N 1/20

(11) 공개번호 특2002 - 0057472
(43) 공개일자 2002년07월11일

(21) 출원번호 10 - 2001 - 0000515
(22) 출원일자 2001년01월05일

(71) 출원인 제일제당주식회사
손 경 식
서울특별시 중구 남대문로5가 500번지

(72) 발명자 심재익
경기도이천시증포동190 - 2선경아파트205 - 1604
이광호
경기도안양시동안구호계2동931삼성아파트104 - 407
한종권
경기도용인시수지읍풍덕천리신창마을상록아파트703 - 2003
이진호
경기도용인시수지읍풍덕천리700 - 1현대아파트104 - 1504
김정환
서울특별시송파구가락2동192극동아파트2 - 303
오윤석
경기도용인시수지읍풍덕천리703동보아파트105 - 205
박장희
서울특별시강서구가양동146 - 5
장재영
서울특별시강서구가양동146 - 5
곽영현
경기도이천시마장면덕평리산522 - 1
이재홍
서울특별시영등포구여의도동40 - 4화랑아파트3 - 102

(74) 대리인 황주명
최학현

심사청구 : 있음

(54) 5' - 크산틸산을 고수올로 생산하는 미생물 코리네박테리움암모니아게네스 씨제이엑스피002 및 그를 이용한5' - 크산틸산 생산방법

요약

본 발명은 5' - 크산틸산(XMP)을 생산하는 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) KFC C - 10743을 친주로 자외선 조사, N - 메틸 - N' - 니트로 - N - 니트로소구아니딘(NMNA) 등의 변이 유발제로 통상적인 방법에 따라 처리하여 친주의 형질을 변형시켜 더욱더 삼투압내성을 강화하기 위한 목적으로 균체외부에 축적된 고농도 용질에 대하여 세포내부에서 농도가 증가되어 삼투압조절에 중요한 역할을 하는 프롤린(L - proline)에 대한 유사체인 아제티딘 카르복실산(L - azetidine - 2 - carboxylic acid) 내성주를 선별하여 보다 더 효율적으로 삼투압에 의한 영향을 배제시켜 5' - 크산틸산을 고수율, 고농도로 배양액중에 직접 축적시키는 미생물에 관한 발명이다.

색인어

코리네박테리움 암모니아게네스, 아제티딘 카르복실산

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 5' - 크산틸산(5' - xanthylic acid, XMP)을 생산하는 미생물 및 그를 이용한 5' - 크산틸산 생산방법에 관한 것으로, 좀더 구체적으로 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) KFCC - 10743의 변이 주로서 더욱더 삼투압 내성 형질을 강화하기 위한 목적으로 균체외부에 축적된 고농도 용질에 대하여 세포내부에서 농도가 증가되어 삼투압조절에 중요한 역할을 하는 프롤린(L - proline)에 대한 유사체인 아제티딘 카르복실산(L - azetidine - 2 - carboxylic acid) 내성주를 선별하여 보다 더 효율적으로 삼투압에 의한 영향을 배제시켜 5' - 크산틸산을 고수율, 고농도로 배양액중에 직접 축적시키는 미생물 및 그를 이용한 5' - 크산틸산 생산방법에 관한 것이다.

5' - 크산틸산은 핵산 생합성 대사계의 중간물질로 동식물의 체내에서 생리적으로 중요한 의미를 가질뿐 아니라 식품, 의약품 및 각종 의료적 이용등 다방면에 이용되고 있으며, 본 발명은 당사에서 개발한 공지의 균주 KFCC - 10743으로부터 프롤린 유사체인 아제티딘 카르복실산(L - azetidine - 2 - carboxylic acid) 내성주를 선별하여 공지의 기술보다 직접발효법으로 고농도, 고수율의 5' - 크산틸산을 생산하는 균주를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

5' - 크산틸산은 퓨린 뉴클레오타이드(Purine nucleotide) 생합성 대사계의 중간 생성물로 5' - 구아닐산(GMP)의 제조 원료로서 중요한 물질이다. 정미성이 강하고 상품적 가치가 높은 5' - 구아닐산의 제조방법으로서 현재 널리 이용되고 있는 방법은 미생물 발효법으로서, 5' - 크산틸산을 생산하고 이를 효소학적으로 5' - 구아닐산으로 전환시키는 과정이 가장 경제적이어서 5' - 구아닐산의 수요만큼 5' - 크산틸산도 필요하다. 종래 5' - 크산틸산의 제조방법에는 화학합성법, 또는 효모중의 리보핵산을 분해하여 제조된 5' - 구아닐산을 탈아미노화하는 제조법, 그리고 발효법으로는 발효배지내 전구물질로 크산틴(Xanthine)을 첨가하는 방법과 미생물 변이주에 의한 제조법, 항생물질 첨가에 의한 제조법(일본특허 소42 - 1477, 소 44 - 20390) 및 계면활성제 첨가에 의한 제조법(일본특허 소42 - 3825, 소42 - 3838) 등이 알려져 있다. 이 중에서도 미생물 변이주에 의한 5' - 크산틸산의 직접적인 발효 제조 방법이 공업적으로 유리하므로 본 발명자들은 기존의 코리네박테리움 암모니아게네스 KFCC - 10743이 보유하고 있는 형질을 개량하여 XMP가 최대한 생산될 수 있는 형질을 부여함으로써 XMP의 생산성이 월등히 증가한 변이주를 개발하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- 대부분의 세균은 균체외부의 삼투압하에서 삼투적 탈수현상을 막기 위해 균체내부의 삼투압을 증가시키는 방법으로 칼륨이온과 오스몰라이트(osmolytes)를 축적하는 유기성 용질을 축적시킨다. 이러한 오스몰라이트에는 프롤린(L - proline)을 축적시킴을 브레비박테리움 락토퍼멘텀(*Brevibacterium lactofermentum*)을 보고 [Agr, Bio, Chem., Vol. 1; 53(9), p2475 - 2479, 1989]하였다. 이외에 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르센스(*Serratia marcescens*) 등에서도 균체내부에 프롤린(L - proline)이 축적되며 이는 외부 삼투압에 의하여 조절됨을 보고 [J, Bacteriol., Vol; 163, p296, 1985]하였다. 따라서 고농도, 고수율의 5' - 크산틸산을 생산하는 균주를 개발하기 위해서는 프롤린(L - proline) 합성능력을 증가시킴으로서 삼투압 내성형질을 강화하고 또한 균체내부의 프롤린(L - proline) 합성증가에 따른 생육과 생화학적 대사과정의 저해를 방지하기 위해 프롤린 유사체 저항성 균주를 획득하는 것이 중요하다고 사료된다.

본 발명자들은 여러 가지 프롤린 유사체(L - proline analogue)에 대한 내성주를 선별하여 실험한 결과 아제티딘 카르복실산(L - azetidine - 2 - carboxylic acid) 내성을 부여한 균주가 직접발효법에 의해 5' - 크산틸산을 기존에 비해서 고농도, 고수율로 생산할수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 구성 및 작용

다음에서 본 발명의 미생물분리 및 획득방법을 좀더 구체적으로 설명한다.

본 발명의 미생물 CJXP002는 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) KFCC - 10743을 친주로하여 자외선조사, N - 메틸 - N' - 니트로 - N - 니트로소구아니딘 (NTG) 등의 변이 유발제로 통상적인 방법에 따라 처리한 후 아제티딘 카르복실산(L - azetidine - 2 - carboxylic acid)이 농도별로 첨가된 (주 3)배지에서 생육할 수 있는 변이주들 중에서 선별된 것이다. 이때 실험에 사용된 배지중의 아제티딘 카르복실산의 농도는 50mg/ml까지 사용하였으며, 아제티딘 카르복실산 농도 30mg/l에서 생육하는 5' - 크산틸산 농도가 향상된 균주를 선별하여, 이 균주를 CJXP002라 명명하여 제 3자에게 일반분양될 수 있도록 서울시 서대문구 홍제동 소재의 한국종균협회에 2000년 12월 21일자로 수탁번호 제 KFCC - 11250호로 기탁하였다.

(주 1) 영양배지 : 포도당 20g/l, 펩톤 10g/l, 효모엑기스 10g/l, 염화나트륨 2.5g/l, 우레아 3g/l, 아데닌 150mg/l, 구아닌 150mg/l, pH 7.2.

(주 2) 최소배지; 포도당 20g/l, 인산제1칼륨 1g/l, 인산제2칼륨 1g/l, 우레아 2g/l, 황산암모늄 3g/l, 황산마그네슘 1g/l, 염화칼슘 100mg/l, 황산철 20mg/l, 황산망간 10mg/l, 황산아연 10mg/l, 비오틴 30μg/l, 티아민산염 0.1mg/l, 황산구리 0.8mg/l, 아데닌 20mg/l, 구아닌 20mg/l, pH 7.2.

(주 3) 아제티딘 카르복실산 첨가배지 : (주2) 최소배지에 아제티딘 카르복실산 5 - 50mg/ml 첨가한 배지.

본 발명에서 분리한 신규의 변이주 CJXP002의 생화학적 특성은 표 1의 기재와 같으며 이들 내용에 의하면 본 발명의 미생물은 30mg/ml 농도의 아제티딘 카르복실산 첨가배지에서도 생육 가능한 균주임을 알 수 있다.

본 발명 미생물의 특성은 다음의 표에 기재된 바와 같다.

아세트산 카르복실산에 대한 내성 비교

아세트산 카르복실산 농도 (g/ml)								
0	5	10	20	30	40	50		
KFCC - 10743	+++	+	-	-	-	-	-	
CJXP002	+++	+++	+++	++	+	-	-	

(주) +: 생육, -: 생육치 못함, 30℃에서 5일 배양

실시예 1

사용 균주: 본 발명의 미생물 CJXP002, KFCC - 10743

종배지: 포도당 30g/l, 펩톤 15g/l, 효모엑기스 15g/l, 염화나트륨 2.5g/l, 우레아 3g/l, 아데닌 150mg/l, 구아닌 150mg/l, pH 7.2

발효배지:

① 본배지: 포도당 60g/l, 황산마그네슘 10g/l, 황산철 20mg/l, 황산아연 10mg/l, 황산망간 10mg/l, 아데닌 30mg/l, 구아닌 30mg/l, 비오틴 100μg/l, 황산구리 1mg/l, 티아민염산염 5mg/l, 염화칼슘 10mg/l, pH 7.2

② 별살배지: 인산제1칼륨 10g/l, 인산제2칼륨 10g/l, 우레아 7g/l, 황산암모늄 5g/l.

발효방법

상기 종배지 5ml을 지름 18mm 시험관에 분주하고 상법에 따라 가압 살균한 후 사용 균주를 접종하고 180rpm으로 30℃에서 18시간 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 발효배지 중 본배지와 별살배지를 각각 상법에 따라 가압 살균하여 미리 가압 살균한 500ml 용량의 진탕용 삼각 플라스크에 29ml과 10ml 씩 분주하고 종배양액 1ml을 식균한 다음 90시간 배양하였다. 회전수는 200rpm, 온도 30℃로 조절하였다. 배양 완료 후 5' - 크산틸산의 배지내 축적량은 기존 균주 KFCC - 10743이 22.1g/l 이며, 본 발명변이주 CJXP002균주는 11% 향상된 24.9g/l 이었다(5' - 크산틸산의 축적농도는 5' - 크산틸산 나트륨· 7H₂O로 표시하였다).

실시예 2

사용균주: 실시예 1과 동일.

1차 종배지: 실시예 1의 1차 종배지와 동일.

2차 종배지: 포도당 60g/l, 인산제1칼륨 2g/l, 인산제2칼륨 2g/l, 황산마그네슘 1g/l, 황산철 22mg/l, 황산아연 15mg/l, 황산망간 10mg/l, 황산구리 1mg/l, 염화칼슘 100mg/l, 비오틴 150ug/l, 아데닌 150mg/l, 구아닌 150mg/l, 티아민염산염 5mg/l, 소포제 0.6ml/l, pH 7.2.

발효배지 : 포도당 151g/l, 인산 32g/l, 수산화칼슘 25g/l, 아데닌 198mg/l, 구아닌 119mg/l, 황산철 60mg/l, 황산아연 42mg/l, 황산망간 15mg/l, 황산구리 2.4mg/l, 알라닌염 22mg/l, NCA 7.5mg/l, 비오틴 0.4mg/l, 황산마그네슘 15g/l, 시스틴염 30mg/l, 히스티딘염 30mg/l, 염화칼슘 149mg/l, 티아민염 15mg/l, 소포제 0.7ml/l, CSL 27ml/l, 참치엑기스 6g/l, pH 7.3.

1차 종배양: 상기 1차 종배양 배지 50ml을 500ml 진탕용 삼각 플라스크에 분주하고 121℃에서 20분간 가압 살균하여 냉각한 후 사용균주를 접종하고 30℃에서 180rpm으로 24시간 진탕 배양하였다.

- 2차 종배양: 2차 종배지를 5리터 용량의 실험용 발효조에 2리터씩 분주하고 121℃에서 10분간 가압 살균한 후 냉각하여 1차 종배양액의 배양완료액 50ml를 접종한 후 공기를 0.5vvm으로 공급하면서 900rpm, 31℃에서 24시간 배양하였다. 배양 중 pH는 암모니아수로 7.3로 조절하였다.

발효방법

상기 발효배지를 30리터 용량의 실험용 발효조에 8리터씩 분주하고 121℃에서 20분간 가압살균한 뒤 냉각하여 2차 종배양액을 1.5리터씩 접종한 후 공기를 1vvm으로 공급하면서 400rpm, 33℃에서 배양하되 배양중 잔존 당농도가 1% 이하가 되면 살균된 포도당을 공급하여 발효배지에 첨가된 총당의 합계가 30%로 조절하였다. 배양 중 pH는 암모니아수로 7.3로 조절하여 90시간 배양하였다. 배양완료 후 5' - 크산틸산의 배지내 축적량은 종래균주 KFCC - 10743 균주는 123.5g/l이고 본 발명의 변이주 CJXP002는 종래균주에 비해 약 13% 향상된 139.5g/l 이었다(5' - 크산틸산의 축적농도는 5' - 크산틸산 나트륨· 7H₂O로 표시하였다).

발명의 효과

본 발명은 5' - 크산틸산(5' - xanthylic acid, XMP)을 생산하는 미생물 및 그를 이용한 5' - 크산틸산 생산방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) KFCC - 10743의 변이주로서 더욱더 삼투압 내성 형질을 강화하기위한 목적으로 균체외부에 축적된 고농도 용질에 대하여 세포내부에서 농도가 증가되어 삼투압조절에 중요한 역할을 하는 프롤린(L - proline)에 대한 유사체인 아제티딘 카르복실산(L - azetidine - 2 - carboxylic acid) 내성주를 선별하여 보다 더 효율적으로 삼투압에 의한 영향을 배제시켜 5' - 크산틸산을 고수율, 고농도로 배양액중에 직접 축적시키는 미생물 및 그를 이용한 5' - 크산틸산 생산방법에 관한 것으로, 기존의 코리네박테리움 암모니아게네스 KFCC - 10743이 소유하고 있는 형질을 개량하여 XMP가 최대로 생산될 수 있는 형질을 부여함으로써 XMP의 생산성이 월등히 증가한 변이주를 개발하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

5' - 크산틸산(XMP)을 생산하고, 아제티딘 카르복실산에 내성을 갖는 코리네박테리움 암모니아게네스 변이주 CJXP002(KFCC - 11250).

청구항 2.

제 1항에 있어서, 극미량 내지 30mg/ml의 아제티딘 카르복실산 존재하에서 생육가능한 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 암모니아게네스 변이주 CJXP002(KFCC - 11250).

청구항 3.

제 1항에 따른 미생물 코리네박테리움 암모니아게네스 변이주 CJXP002(KFCC - 11250)를 1차 종배지에서 30℃, 180rpm, pH 7.3에서 24시간 진탕배양한 후, 2차 종배지에서 31℃, 900rpm, pH 7.3에서 24시간 진탕배양하여 활성화시킨 후, 발효배지에서 33℃, 400rpm에서 90시간동안 진탕배양하면서, 배양액내 잔존 당농도가 1%이하이면 포도당이 첨가된 추가당을 배양액내 총당함량이 30%가 되도록 첨가하여 배양하는 것을 특징으로 하는 5' - 크산틸산의 생산방법.